Aus dem II. Physiologischen Institut der Universität des Saarlandes
(Direktor: Prof. Dr. rer. nat. H. Passow)

Vergleichende Untersuchungen der Kaliumpermeabilität an Erythrozyten und Erythrozyten-Stromata in hypertonen Lösungen

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1971

vorgelegt von

KLAUS GÜNTHER

geb. am 26. 10. 1941 in Würzburg

Dekan: Prof. Dr. med. H. Kulenkampff
Referent: Prof. Dr. rer. nat. H. Passow

Aus dem II. Physiologischen Institut der Universität des Saarlandes
(Direktor: Prof. Dr. rer. nat. H. Passow)

Vergleichende Untersuchungen der Kaliumpermeabilität an Erythrozyten und Erythrozyten-Stromata in hypertonen Lösungen

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1971

vorgelegt von

KLAUS GÜNTHER
geb. am 26. 10. 1941 in Würzburg

Dekan: Prof. Dr. med. H. Kulenkampff
Referent: Prof. Dr. rer. nat. H. Passow

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 4. 3. 1971 bestanden.

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	4
II.	Methodik	10
III.	Ergebnisse	18
IV.	Diskussion	27
V.	Zusammenfassung	35
VI.	Literaturverzeichnis	37

I. Einleitung

In stark hypertonischen Kochsalzlösungen werden rote Blutkörperchen Kationen-permeabel. Sie verlieren Kalium und nehmen Natrium aus dem Medium auf. Dabei schwellen die Zellen an und gehen schließlich durch kolloidosmotische Hämolyse zugrunde. Die Ursachen für die Permeabilitätsänderung sind bisher ungeklärt. Eine Steigerung der Ionenstärke des Mediums kann zu mannigfachen Änderungen der Membranstruktur Anlaß geben. So könnte es beispielsweise zu einer Spaltung von Ionenbindungen kommen und damit zu mehr oder weniger ausgedehnten Änderungen der Lipoproteinstruktur der Zellmembran.

Ebenso könnten von der Ionenstärke abhängige Konformationsänderungen von Membranproteinen Permeabilitätsänderungen herbeiführen. Eine besonders einfache Erklärung des Verlustes der Kationenselektivität in Lösungen hoher Ionenkonzentration bietet die sogenannte "Festladungshypothese" der Selektivität der Erythrozytenmembran.

Mit Hilfe der Festladungshypothese versucht man die Beobachtung zu erklären, daß die Erythrozytenmembran für Anionen etwa 1 Million-mal leichter durchlässig ist als für Kationen. Sie geht von der Annahme aus, daß in der Erythrozytenmembran positive Festladungen vorhanden sind, die die Kationen zurückhalten, ohne die Bewegungen der Anionen zu beeinflussen. In einer solchen Membran kommt die Selektivität weitgehend durch den sogenannten "Donnan-Effekt" zustande. Die Anionen werden zur Aufrechterhaltung der Elektroneutralität in der Membran angereichert, während die Kationen praktisch ausgeschlossen bleiben (Koionen-Exklusion). Eine derartige Koionen-Exklusion durch Festladungen kann weitgehend vermindert oder gar völlig unterdrückt werden, wenn die Konzentration diffusibler Koionen in dem an die Membran angrenzenden Medium von derselben Größenordnung wird wie die Ladungsdichte der Membran selbst. Man muß daher erwarten, daß mit zunehmender Ionenkonzentration im Medium die Selektivität der Membran erheblich abnimmt und - falls die Konzentration diffusibler Kationen im Medium sehr viel größer wird als die Konzentration fixierter Kationen in der Membran - praktisch völ-

lig verschwindet (PASSOW, 1969a). Eine notwendige Konsequenz dieser Festladungshypothese besteht darin, daß die Koionen-Exklusion unabhängig von der chemischen Natur der im Medium vorhandenen Kationen sein sollte. Man müßte also finden, daß Immersion der Erythrozyten in hypertonischen Lithium-, Rubidium-, Calcium- oder Magnesium-Chlorid-Lösungen den gleichen Effekt hat wie Immersion in hypertonischer Kochsalzlösung. Das wurde auch tatsächlich gefunden. Überdies wurde beobachtet, daß der einmal eingetretene Effekt durch Wiederherstellung der Isotonie momentan wieder rückgängig gemacht werden kann. Auch diese Beobachtung ist eine Voraussetzung für die Gültigkeit des Festladungskonzeptes, obwohl sie selbstverständlich seine Gültigkeit nicht beweist (PASSOW, 1969 b).

Unabhängig vom Festladungskonzept gäbe es aber noch eine andere Erklärungsmöglichkeit: DAVSON (1936) hat an Katzenerythrozyten beobachtet, daß ihre Permeabilität für Kalium und Natrium außerordentlich stark vom Zellvolumen abhängig ist. Mit zunehmendem Schwellungs-

zustand der Zellen nimmt ihre Permeabilität für Kalium zu, für Natrium ab. Beim Schrumpfen liegen die Verhältnisse gerade umgekehrt. Diese Beobachtungen sind nicht unmittelbar vergleichbar den oben mit für Menschenerythrozyten in hypertonischen Lösungen beschriebenen. Insbesondere gibt es bei den Menschenerythrozyten nicht dieses reziproke Verhalten von Kalium und Natrium. Dennoch legen sie den Gedanken nahe, daß der Verlust der Kationenselektivität bei hohen Tonizitäten nicht notwendigerweise als eine Folge des Festladungskonzeptes erklärt werden muß, sondern mit dem Schrumpfen der Zellen in stark hypertonischen Lösungen zusammenhängen könnte. So muß man daran denken, daß bei Tonizitäten über 2,5-mal isotonisch das Erythrozytenvolumen sich auch bei weiterer Steigerung der Tonizität im Medium nur noch sehr wenig ändern kann: die Zellen haben ihr Minimalvolumen erreicht (PASSOW und EGGERS, 1950). Jede weitere Steigerung der Tonizität könnte daher zu mechanischen Alterationen der Membran führen, indem die Membran zunehmend stärker auf den Erythrozyteninhalt gepreßt wird.

Um zu entscheiden, ob die Permeabilitätsänderung durch mechanische Verformung der Erythrozyten bei hohen Tonizitäten zustandekommt, oder ob eine Erklärung auf der Basis der Festladungshypothese brauchbar sein könnte, wurden Untersuchungen mit Erythrozytenghosts ausgeführt. Aus diesen Ghosts wurden die festen Inhaltstoffe des Erythrozyten durch hypotonische Hämolyse entfernt. Die Membran wurde dann durch eine Wiederabdichtungsprozedur wieder hergestellt, die besonders von TOSTESON, WHITTAM und HOFFMAN (1960) entwickelt und von PASSOW (1969c) modifiziert wurde. In diesen Erythrozytenghosts kann die Schrumpfung, wie von TEORELL (1952) nachgewiesen wurde, ungehindert bis zu sehr kleinen Volumina fortschreiten. Mechanische Effekte durch ein Aufpressen der Zellmembran auf die Zellinhaltstoffe sollten hier minimal sein. Gleichzeitig wurde ein zweites Verfahren erprobt; es wurde der Versuch gemacht, Erythrozytenstromata in Lösungen steigender Tonizitäten wieder abzudichten und dann ihr Verhalten in hypertonischen Lösungen zu untersuchen. Auf diese Weise verhindert man von vornherein das Auftreten eines osmotischen Druckunter-

schiedes zwischen dem Zellinnern und der Außenlösung. Obwohl die Zellen in hypertonischen Lösungen suspendiert werden, bleibt ihr Zellvolumen unabhängig von der Tonizität.

II. Methode

1. Prinzip

Der Zellinhalt von menschlichen Erythrozyten wird durch hypotone Hämolyse entfernt und durch Kaliumchlorid in verschiedenen Konzentrationen ersetzt, indem dem Hämolysat soviel einer 3,32 M/l KCl-Lösung zugesetzt wird, bis die gewünschte Konzentration erreicht ist.

Anschließend wird die Membran bei 37 ^{o} C 60 Minuten lang inkubiert. Während dieser Periode bekommt die Membran ihre ursprüngliche Impermeabilität für Kationen wieder.

Der Kalium-Verlust der Erythrozyten-Stromata wird dann in NaCl-Lösungen steigender Tonizität bei 37 ^{o} C als Funktion der Zeit gemessen; ebenso die Hämolyse als Kontrolle für die Intaktheit der Membran.

2. Einzelheiten der Ausführung

a) Präparation der Erythrozyten-Stromata:

50 ml menschliches Venenblut aus der V. cubiti wird in einen Erlenmeyerkolben, der 10 ml 3,8 %iges Natriumcitrat enthält, überführt.

Das Blut wird 10 Minuten bei 1600 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die sedimentierten Erythrozyten mit 166 mM/l bei pH 7,3 TRIS-gepufferter NaCl-Lösung resuspendiert.

Dieser Waschvorgang wird zweimal wiederholt. Nach der Waschung wird das Sediment mit 166 mM/l TRIS - pH 7,3 - versetzt und eine 50 %ige Suspension hergestellt. Je 3 ml dieser Suspension werden in 6 verschiedene Zentrifugengläser (40 - 50 ml), die in einem Eisbad von 0 °C stehen, pipettiert.

Je 3 ml Blutsuspension werden mit je 30 ml 4 mM/l $MgCl_2$-Lösung bei 0 °C hämolysiert. Genau 5 Minuten später werden allen 6 Ansätzen 1,74 ml einer 3,32 M/l KCl-Lösung zugesetzt, so daß man überall eine Konzen-

tration von 166 mM/l KCl erhält. Die Suspensionen werden anschließend für weitere 5 Minuten im Eisbad bei 0 ^{o} C belassen. Nun werden die 6 Ansätze in ein Wasserbad von 37 ^{o} C gebracht und 60 Minuten später in einer Kühlzentrifuge (0 ^{o} C) für 10 Minuten bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer feinen Glaskapillare über eine Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Sediment der 6 Proben wird mit genau 30 ml einer mit TRIS-Puffer auf pH 7,3 eingestellten 166 mM/l NaCl-Lösung von 0 ^{o} C versetzt, aufgeschüttelt und wieder wie oben zentrifugiert; dieser Waschvorgang wird insgesamt zweimal durchgeführt. Das Sediment der letzten Waschung besteht aus den mit 166 mM/l KCl beladenen Erythrozyten-Stromata.

b) Messung des Kaliumverlustes:

Die 6 Ansätze werden nun bei 37 ^{o} C mit TRIS-gepufferten NaCl-Lösungen - pH 7,3 - verschiedener Tonizität versetzt und geschüttelt:

Ansatz I	:	166 mM/l NaCl	pH 7,3	=	1 x	isoton
Ansatz II	:	664 mM/l NaCl	pH 7,3	=	4 x	isoton
Ansatz III	:	995 mM/l NaCl	pH 7,3	=	6 x	isoton
Ansatz IV	:	1162 mM/l NaCl	pH 7,3	=	7 x	isoton
Ansatz V	:	1826 mM/l NaCl	pH 7,3	=	11 x	isoton
Ansatz VI	:	2158 mM/l NaCl	pH 7,3	=	13 x	isoton

Nun werden in Abständen von ca. 3, 10, 30, 60 und 120 Minuten je 3 ml aus den Ansätzen I bis VI in 6 bereitstehende Zentrifugengläser pipettiert, in denen sich genau 30 ml einer bei pH 7,3 TRIS-gepufferten Cholinchlorid-Lösung von 0 ^{o} C befindet. Die Tonizitäten dieser Lösungen entsprechen denen, der zuvor verwendeten NaCl-Lösung:

$I_{1 \cdots 5}$	:	166 mM/l Cholin-Cl	pH 7,3
$II_{1 \cdots 5}$	:	664 mM/l Cholin-Cl	pH 7,3
$III_{1 \cdots 5}$	:	995 mM/l Cholin-Cl	pH 7,3
$IV_{1 \cdots 5}$	:	1162 mM/l Cholin-Cl	pH 7,3
$V_{1 \cdots 5}$	:	1826 mM/l Cholin-Cl	pH 7,3
$VI_{1 \cdots 5}$	:	2158 mM/l Cholin-Cl	pH 7,3

Die 6 Ansätze werden jetzt ca. 2 Minuten in einer Kühl-

zentrifuge bei 0 °C zentrifugiert. Der Überstand wird danach wie oben abgesaugt und das Sediment mit etwas H_2O aus der Spritzflasche resuspendiert und für ca. 12 Stunden bei 0 °C gehalten, damit in dieser Zeit durch hypertone Hämolyse der Zellinhalt austreten kann. Zusätzlich zu dieser Abnahme wird eine Probe aus der nicht zentrifugierten Suspension genommen (= Gesamtwert).

c) Flammenphotometrische Kaliumionenbestimmung:

Den in den Zeiten t_1 - t_5 gemachten Abnahmen der Ansätze I_o - VI_o werden je 1,5 ml NaCl-Lösung, die bei pH 7,3 gepuffert ist, zugesetzt. Damit wird erreicht, daß der Natrium-Gehalt der Abnahmen t_1 - t_5 dem des Suspensionsmediums der Ghosts entspricht:

$I_{1 \cdots 5}$	:	1,5 ml	166 mM/l NaCl
$II_{1 \cdots 5}$	:	1,5 ml	664 mM/l NaCl
$III_{1 \cdots 5}$	:	1,5 ml	995 mM/l NaCl
$IV_{1 \cdots 5}$	:	1,5 ml	1162 mM/l NaCl
$V_{1 \cdots 5}$	:	1,5 ml	1826 mM/l NaCl
$VI_{1 \cdots 5}$	:	1,5 ml	2158 mM/l NaCl

Somit läßt sich die Messung des Kaliumionenverlustes von t_1 - t_5 durchführen und mit dem Gesamtwert (t = 0) vergleichen, da der bei der Flammenphotometrie störende Natriumgehalt der Suspension konstant gehalten wurde. Die einzelnen Proben werden zur flammenphotometrischen Messung mit einem Meßkolben auf 50 ml aufgefüllt. Ebenfalls werden von den Ansätzen I_o - VI_o je 3 ml entnommen und auf 50 ml aufgefüllt. Die Kaliumverluste in der Zeit, bei den verschiedenen Tonizitäten des Mediums, werden in % zum Gesamtwert angegeben. Die Messungen erfolgen in dem Flammenphotometer "Eppendorf".

d) Hämolysebestimmung:

Die flammenphotometrisch gemessenen Kaliumwerte wurden durch die Hämolysegrade dividiert, um den effektiven Kaliumionenverlust in der Zeit bestimmen zu können.

Aus den Proben, in denen der Kaliumionengehalt gemessen wurde, werden je 4 ml mit einer Vollpipette abgenommen und in bereitstehende Reagenzgläser gebracht. Jeder dieser Proben wird nun zur Hämolyse der Ghosts 1 ml einer 1 %igen (oberflächenaktiven) CUTSCUM-Lösung zu-

gesetzt und dann geschüttelt.

Um eine genaue photometrische Bestimmung durchführen zu können, muß nach Zusatz von CUTSCUM zu den Proben mindestens 30 Minuten bis zur Messung gewartet werden, da sonst eine zu große Trift angezeigt wird, die das Ablesen der Extinktion unmöglich macht. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 418 mµ. Die abgelesenen Extinktionen der Proben $I_{1 \ldots 5}$ - $VI_{1 \ldots 5}$ werden in % zu den Extinktionen der Gesamtwerte I_o - VI_o registriert.

e) Hämolysebestimmung bei intakten Erythrozyten nach der Zyanhämiglobin-Methode:

Die flammenphotometrische Bestimmung der Kaliumionen und die Vorbereitung zu dieser Messung erfolgt wie bei Versuch 1, ebenfalls die Hämolysebestimmung.
Nur die Hämolysemessung der Proben mit intakten Erythrozyten (IV_{o-5} und $VIII_{o-5}$) wird nach der Zyanhämiglobin-Methode durchgeführt:

Von den Proben IV_{o-5} und $VIII_{o-5}$ werden je 5 ml mit einer Vollpipette entnommen und in bereitstehende Reagenz-

gläser gebracht. Jedem dieser Gläser wird nun 2,5 ml Hb-Phosphatpuffer pH 7,4 und zwei Tropfen 1 M/l KCN-Lösung sowie zwei Tropfen 5 %iger Kaliumferrizyanid-Lösung zugesetzt und geschüttelt; die elektrophotometrische Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von 546 mμ.

Die abgelesenen Extinktionen der Proben IV_{1-5} und $VIII_{1-5}$ werden in % zu den Extinktionen der Gesamtwerte IV_{o} und $VIII_{o}$ angegeben.

III. Ergebnisse

1. Die Abbildung 1 zeigt den Kaliumverlust von isoton beladenen Erythrozyten-Stromata (166 mM/l KCl) in hypertonen NaCl-Lösungen (1, 4, 6, 7, 11, 13 mal isoton) als Medium. Der Kaliumausfluß wächst also mit steigender Tonizität des Mediums.

   Zur graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse wurde der Quotient aus Kaliumgehalt und Hämolysegrad gebildet und in % des Wertes zu Versuchsbeginn (t = 0) angegeben. Somit kann man den Kaliumverlust der Erythrozyten-Stromata als Funktion der Zeit angeben.

2. Der Vergleich des Kalimverlustes von mit 166 mM/l KCl beladenen Erythrozyten-Stromata einerseits und intakten Erythrozyten andererseits in isotoner und 10mal isotoner NaCl-Lösung als Medium ergibt, daß die Stromata im isotonen NaCl-Medium scheinbar mehr Kalium verlieren als intakte Zellen. In 10mal isotonen NaCl-

Lösungen als Medium verlieren umgekehrt die intakten Zellen ihr Kalium sehr viel schneller als die Stromata (Abbildung 2). Methodisch wird im einzelnen wie bei 1. verfahren. Der Hämolyse-Lösung (4 mM/l $MgCl_2$) wird wie folgt NaCl in verschiedener Konzentration zugesetzt:

Ansatz I_o	:	4 mM/l $MgCl_2$	+	0	x isot. NaCl
Ansatz II_o	:	4 mM/l $MgCl_2$	+	0, 3	x isot. NaCl
Ansatz III_o	:	4 mM/l $MgCl_2$	+	0, 35	x isot. NaCl
Ansatz IV_o	:	4 mM/l $MgCl_2$	+	1, 0	x isot. NaCl
Ansatz V_o	:	4 mM/l $MgCl_2$	+	0	x isot. NaCl
Ansatz VI_o	:	4 mM/l $MgCl_2$	+	0, 3	x isot. NaCl
Ansatz VII_o	:	4 mM/l $MgCl_2$	+	0, 35	x isot. NaCl
Ansatz $VIII_o$	:	4 mM/l $MgCl_2$	+	1, 0	x isot. NaCl

Die Hämolyse-Lösung (4 mM/l $MgCl_2$ + NaCl) hat wie bei Versuch 1 eine Temperatur von 0 ^{o} C.

Nach genau 5 Minuten wird jedem der Ansätze 1, 74 ml einer 3, 32 M/l KCl-Lösung zugesetzt. Nach weiteren 5 Minuten werden die Ansätze für 60 Minuten in ein Wasserbad von 37 ^{o} C gebracht. Die weitere Behandlung

ist wie bei Versuch 1.

Durch den Zusatz von NaCl in verschiedenen Konzentrationen zur Hämolyse-Lösung entstehen bei I_o und V_o Erythrozyten-Stromata und bei IV_o und $VIII_o$ werden die Erythrozyten nicht hämolysiert und bleiben intakt. Bei II_o und III_o sowie VI_o und VII_o liegen Mischungen von intakten Erythrozyten und Stromata, entsprechend der Resistenz der Populationen, vor.

Die Sedimente der Ansätze I_o und III_o werden mit je 30 ml einer NaCl-Lösung pH 7,3 von 37 ^{o}C mit folgender Tonizität versetzt und geschüttelt:

Ansatz I_o	:	166 mM/l NaCl pH 7,3	=	1 x isot.
Ansatz II_o	:	166 mM/l NaCl pH 7,3	=	1 x isot.
Ansatz III_o	:	166 mM/l NaCl pH 7,3	=	1 x isot.
Ansatz IV_o	:	166 mM/l NaCl pH 7,3	=	1 x isot.
Ansatz V_o	:	1660 mM/l NaCl pH 7,3	=	10 x isot.
Ansatz VI_o	:	1660 mM/l NaCl pH 7,3	=	10 x isot.
Ansatz VII_o	:	1660 mM/l NaCl pH 7,3	=	10 x isot.
Ansatz $VIII_o$	:	1660 mM/l NaCl pH 7,3	=	10 x isot.

3. Es wurden die Kaliumionenverluste von Erythrozyten-Stromata bei innen und außen gleichzeitig steigenden Tonizitäten gemessen. Methodisch wurde wie folgt verfahren:
Die Erythrozyten-Stromata wurden so präpariert, daß in ihrem Zellinnern die gleiche Tonizität herrscht wie im Medium. Der Vorgang ist der gleiche wie beim Versuch 1, nur daß Zentrifugengläser von einer Kapazität von 200 ml benutzt wurden. Nach Zusatz von je 30 ml einer 4 mM/l $MgCl_2$-Lösung 0 ^{o} C werden nach einer Zeitspanne von 5 Minuten folgende Mengen einer 3,32 M/l KCl-Lösung zugesetzt, damit die Stromata mit verschiedenen KCl-Konzentrationen inkubiert werden können:

Ansatz I_o	:	1,74	ml der KCl-Stammlösung	=	166 mM/l
Ansatz II_o	:	8,25	ml der KCl-Stammlösung	=	664 mM/l
Ansatz III_o	:	14,12	ml der KCl-Stammlösung	=	995 mM/l
Ansatz IV_o	:	16,6	ml der KCl-Stammlösung	=	1162 mM/l
Ansatz V_o	:	40,3	ml der KCl-Stammlösung	=	1826 mM/l
Ansatz VI_o	:	61,3	ml der KCl-Stammlösung	=	2158 mM/l

Nach 5 Minuten werden die 6 Ansätze für 60 Minuten in ein Wasserbad von 37 ^{o} C gebracht und wie bei Versuch 1 weiter behandelt.

Zur flammenphotometrischen Bestimmung werden die Sedimente der Proben I_{o-5} auf je 50 ml und die restlichen Proben II_{o-5} - $VIII_{o-5}$ auf je 100 ml in einem Meßkolben verdünnt, da bei den letzteren eine sehr grosse Kaliumkonzentration vorhanden ist. Somit können die Messungen in demselben Bereich wie bei I_{o-5} durchgeführt werden.

Ansonsten erfolgt die gleiche Methode wie bei Versuch 1. Zur Darstellung der Ergebnisse wird der Quotient aus Kaliumionenmessung und Hämolysegrad gebildet und in % des Wertes zu Versuchsbeginn (t = 0) angegeben (Abbildung 3).

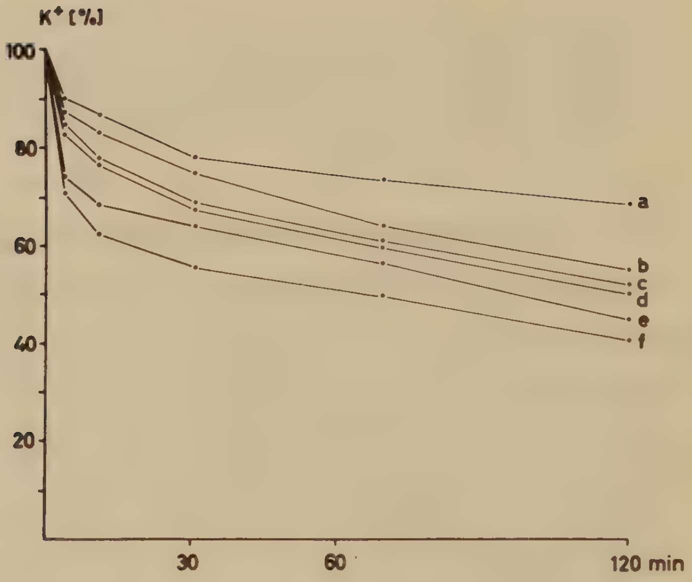


Abbildung 1: Wirkung hypertonischer NaCl-Lösungen auf die Kaliumpermeabilität von Erythrozyten-Stromata, beladen mit 166 mM/l KCl.

Temperatur 37 °C, pH 7,3. Ordinate: Kaliumgehalt in % des Anfangswertes; Abszisse: Zeit in Minuten.

NaCl-Konzentration des Mediums in mM/l:

a = 166, b = 664, c = 995, d = 1162, e = 1826, f = 2158.

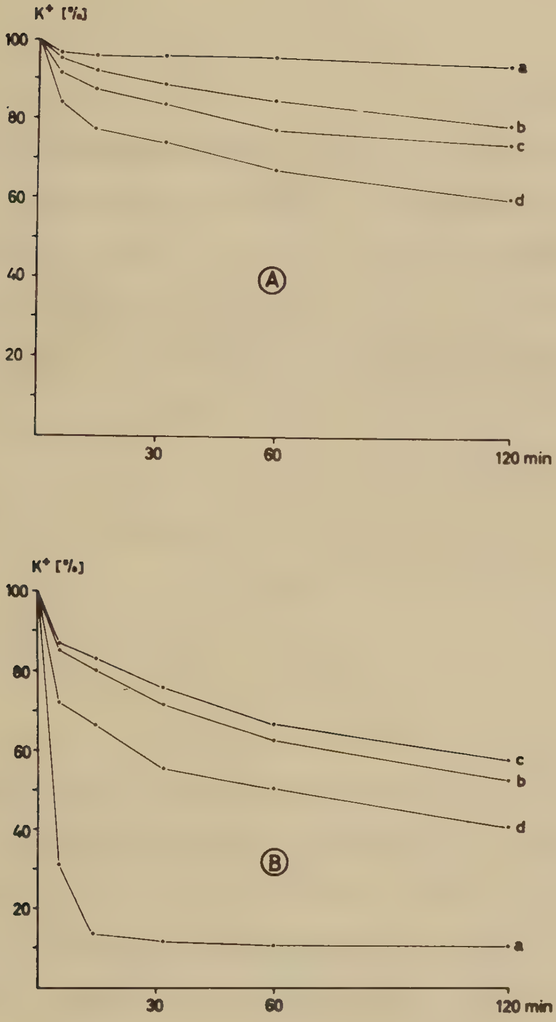


Abbildung 2: Vergleich der Kaliumpermeabilität von intakten Erythrozyten und Erythrozyten-Stromata in isotonischer (A) und 10mal isotonischer (B) NaCl-Lösung

als Medium.

Temperatur 37 ^{o} C, pH 7,3. Ordinate: Kaliumgehalt in % des Anfangswertes. Abszisse: Zeit in Minuten.

a = intakte Erythrozyten, b und c = Mischungen von intakten Erythrozyten und Erythrozyten-Stromata, entstanden durch Hämolyse in 58 mM/l NaCl (= 0,35 mal isoton) (b) und 50 mM/l NaCl (= 0,30 mal isoton) (c), d = Erythrozyten-Stromata.

Die Hämolyse-Lösungen b und c enthielten zudem 4 mM/l $MgCl_2$ wie bei allen Versuchen.

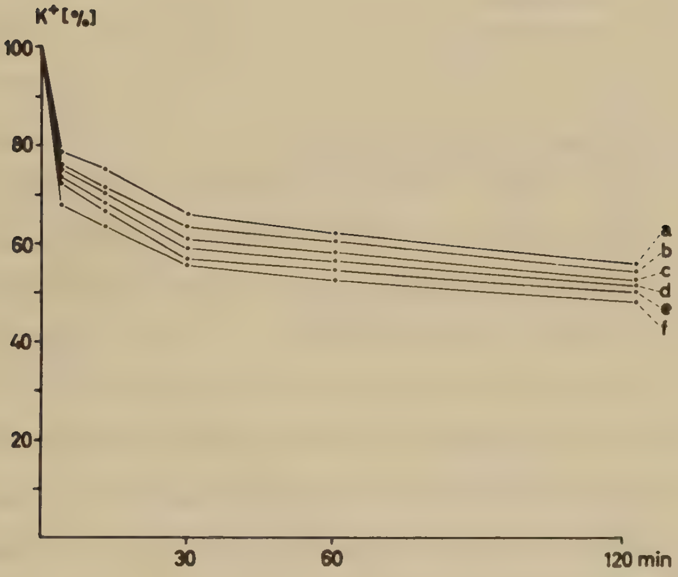


Abbildung 3: Wirkung von hypertonischer NaCl-Lösung auf die Kaliumpermeabilität von Erythrozyten-Stromata, beladen mit 166 (a), 664 (b), 995 (c), 1162 (d), 1826 (e), 2158 (f) mM/l KCl. Temperatur 37 ^{o} C, pH 7,3. Ordinate: Kaliumgehalt in % des Anfangswertes. Abszisse: Zeit in Minuten.

NaCl-Konzentration des Mediums bei a = 166, b = 664, c = 995, d = 1162, e ≐ 1826, f = 2158 mM/l, d.h. innen und außen gleiche Tonizitäten.

IV. Diskussion

Das wesentliche Ergebnis der vorliegenden Versuche bestand in dem Befund, daß Erythrozyten-Stromata, die mit isotonischer KCl-Lösung gefüllt wurden, bei Immersion in Lösungen steigender Tonizität zwar Kaliumverlust erleiden, daß dieser Kaliumverlust aber sehr viel geringer ist als der, den man bei intakten Erythrozyten bei gleichen Tonizitäten findet. Dieses Ergebnis zeigt, daß der Kaliumverlust sicher nicht allein eine Folge der Erhöhung der Ionenkonzentration des Mediums sein kann, sondern daß offenbar das Fehlen des Zellinhaltes der Membran eine wesentlich größere Resistenz gegenüber Behandlung mit hypertonischen Lösungen verleiht.

Leider lieferten die Experimente, in denen der Versuch gemacht wurde, Erythrozyten-Stromata mit Lösungen steigenden Kalium-Chlorid-Gehaltes zu füllen und in Lösungen derselben Tonizität zu resuspendieren, die ihr jeweiliger Zellinhalt besitzt, kein eindeutiges Ergebnis. Mit zuneh-

mender Tonizität werden die Stromata zunehmend stärker permeabel für Kalium. Es bleibt aber unklar, ob dieser Effekt darauf beruht, daß die hohe Tonizität eine Permeabilitätsänderung herbeiführt, oder ob sie lediglich bedingt, daß der Wiederabdichtungsprozeß, der den Permeabilitätsmessungen vorausgehen muß, nicht mehr ungestört ablaufen konnte.

Seit Abschluß dieser Versuche konnte indessen von GUTH und PASSOW (Abb. 4) gezeigt werden, daß Immersion von Erythrozyten in Lösungen steigender Tonizität nur eine sehr geringfügige Änderung der Kationenpermeabilität hervorruft, wenn man dafür sorgt, daß die Tonizität im Zellinneren und in der Außenlösung jeweils gleich groß ist; mit anderen Worten, indem man verhindert, daß die Zellen bei Immersion in Lösungen steigender Tonizität schrumpfen. Die Versuche wurden durchgeführt, indem die Zellmembranen vorübergehend durch Zugabe von Parachloromercuribenzensulfonat (PCMBS) für Kationen permeabel gemacht wurden. Sie wurden in diesem Zustand über Nacht in Lösungen konstanter KCl-Konzentration und

steigender NaCl-Konzentration aequilibriert, bis der Zellinhalt die entsprechenden Konzentrationen (K +-Na) erreicht hatte. Anschließend wurden sie in ihrem hypertonischen Medium nach Zugabe von Cystein gewaschen und auf diese Weise das PCMBS aus der Zelloberfläche entfernt. Die Membranen gewinnen dann ihre ursprüngliche Impermeabilität weitgehend zurück. Die Abbildung 4 zeigt, daß der Kaliumverlust aus Erythrozyten, deren Zellinhalt nach der beschriebenen Methode hypertonisch gemacht wurde, in hypertonischen Lösungen außerordentlich gering bleibt. Sie zeigen deutlich, daß das Schrumpfen der Zellen eine wesentliche Voraussetzung für den Eintritt des außerordentlich raschen Kaliumverlustes ist.

In früheren Untersuchungen über die Abhängigkeit der Anionenpermeabilität roter Blutkörperchen von pH und der Ionenstärke war es möglich gewesen, die Festladungsdichte der Membran annähernd zu bestimmen. Ein Wert von 2,5 Mol/l wurde erhalten (PASSOW, 1969a). Auf Grund dieser Zahl ist es möglich vorauszuberechnen, wie sich die Kationenkonzentrationen im Innern der Membran bei zu-

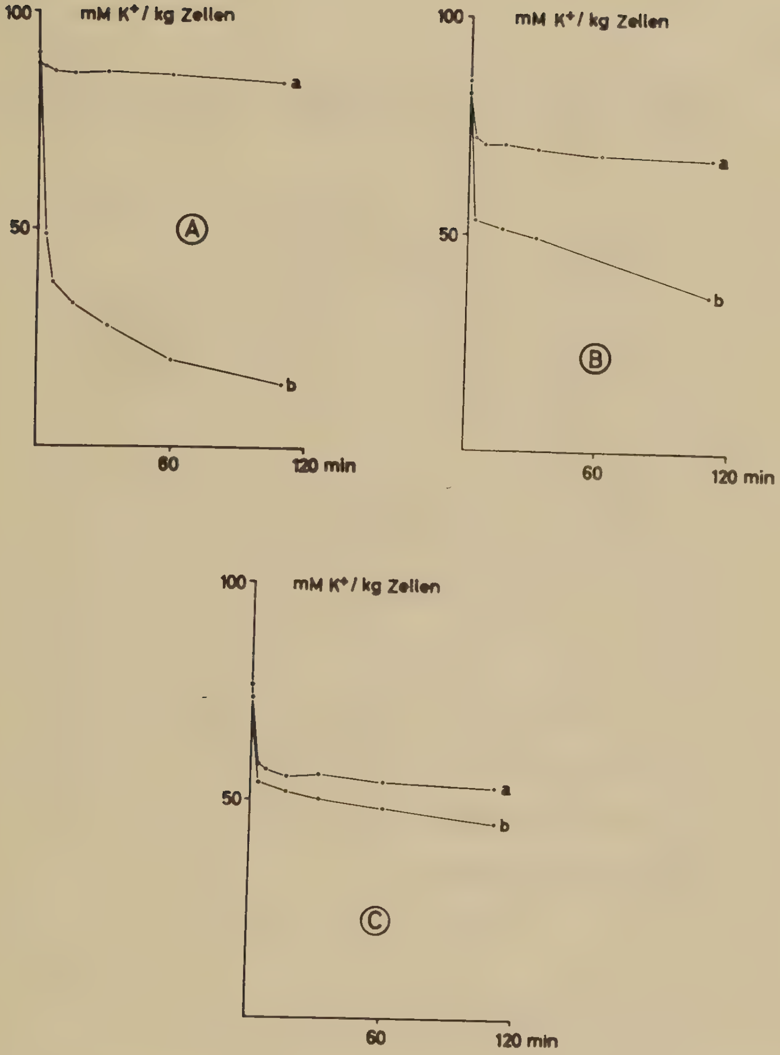
nehmender Ionenstärke ändern sollten. Der Kationenflux durch die Membran sollte der Kationenkonzentration in ihrem Inneren etwa proportional sein. Mit Hilfe der Donnan-Theorie läßt sich für das Verteilungsverhältnis Kationen im Medium : Kationen in der Membran folgende Gleichung ableiten (DONNAN, 1911):

$$r = \sqrt{1 + \left[\frac{\omega \cdot x}{2a}\right]^2} - \frac{\omega \cdot x}{2a}$$

Die Symbole haben hier folgende Bedeutung: r = Verteilungsverhältnis Membran : Medium, ω = Vorzeichen der Ladung der Festladungen, x = Konzentration der Festladungen, a = Elektrolytkonzentration im an die Membran angrenzenden Medium.

Die folgende Tabelle I enthält die für vier Tonizitäten berechneten Verteilungsverhältnisse. In ihrer letzten Spalte ist angegeben, wie die Koionenkonzentration in der Membran mit der Tonizität zunimmt. Die Werte sind dabei auf die Konzentration in einer isotonischen NaCl-Lösung bezogen. Man erkennt, daß die Kaliumkonzentration in der Membran, bei einer Steigerung der Tonizität um das

20fache, um etwa das 10fache ansteigen sollte. Eine entsprechende Vergrößerung des Kaliumeffluxes wäre zu erwarten. Die Festladungshypothese sagt also nur eine relativ geringfügige Steigerung des Kaliumeffluxes voraus, zumindest im Vergleich zu den Beobachtungsergebnissen an intakten Erythrozyten. An intakten Erythrozyten nimmt der Kaliumefflux beim Übergang von einer einfach zu einer zehnfach isotonischen Lösung um das etwa 1500fache zu (Tab. I).



<u>Abbildung 4</u> (nach GUTH und PASSOW): Wirkung von hypertonischen NaCl-Lösungen auf die Kaliumpermeabilität von Erythrozyten, die in Gegenwart von 0,05 mM/l PCMBS in

Lösungen folgender Konzentrationen aequilibriert worden waren:

A : (100 KCl + 66 NaCl) mM/l = 1 x isoton

B : (100 KCl + 232 NaCl) mM/l = 2 x isoton

C : (100 KCl + 564 NaCl) mM/l = 4 x isoton

Nach 12 Stunden wurde das PCMBS durch Waschen mit Cystein entfernt.

Die vorbehandelten Zellen wurden in Medien resuspendiert, welche diesen Tonizitäten entsprachen, wie den Medien, in denen der intrazelluläre Kaliumgehalt eingestellt wurde (a). Dadurch war an Stelle des KCl eine entsprechende Menge NaCl vorhanden, so daß die Medien alle NaCl enthielten. b = 10mal isotone NaCl-Lösung als Medium. Temperatur 25 $^{\circ}$C. Ordinate: Kaliumkonzentration in mM/kg Zellen. Abszisse: Zeit in Minuten.

Tabelle I

$\omega \cdot x \quad = \quad + 2,5$ Mol/l

a = 0,166 Mol/l (= 1 x isot.)

a = 0,830 Mol/l (= 5 x isot.)

a = 1,66 Mol/l (= 10 x isot.)

a = 3,32 Mol/l (= 20 x isot.)

$$r = \sqrt{1 + \left[\frac{\omega \cdot x}{2a}\right]^2} - \frac{\omega \cdot x}{2a}$$

a in Mol/l	r
0,166	0,066
0,830	0,302
1,66	0,499
3,32	0,692

V. Zusammenfassung

Man kann also feststellen, daß der Kaliumverlust intakter Erythrozyten in hypertonischen Lösungen nur dann eintreten kann, wenn es den Zellen möglich ist, in diesen Lösungen zu schrumpfen. Nur ein geringer Teil des Kaliumverlustes persistiert, wenn diese Schrumpfung durch geeignete Maßnahmen verhindert wird. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse festzustellen, daß bei Tonizitäten von über 5mal isotonisch das Erythrozytenvolumen auch bei weiterer Steigerung der Tonizität nur noch wenig abnehmen kann (PASSOW und EGGERS, 1950). In der zitierten Arbeit wurde überdies gefunden, daß die Erythrozyten von etwa 3mal isotonischen Lösungen an keine Stechapfelform mehr bilden, sondern in ihrer überwiegenden Anzahl platte, scheibenförmige Gebilde darstellen, deren Durchmesser sehr viel größer zu sein scheint als der intakter Erythrozyten. Auch die Gestalt der Erythrozyten ändert sich mit weiterer Steigerung der Tonizität nicht mehr. Vergleicht man diese Be-

funde mit der Tatsache, daß der Kaliumverlust erst in etwa 6fach isotonischen Lösungen wirklich ausgeprägt wird und dann bei weiterer Steigerung der Tonizität bis zu etwa 10-fach hinauf (der Grenze, bei der der Kaliumverlust so rasch wird, daß wir ihn nicht mehr mit unseren Meßmethoden verfolgen können), so ergibt sich, daß der Kaliumverlust sicher nicht allein auf einer Schrumpfung der Zellen oder auf einer Fältelung der Membran beruhen kann. Es ist naheliegend anzunehmen, daß mechanische Ereignisse, wie der zunehmende Druck, unter dem die Membran auf den Zellinhalt gepreßt wird, oder aber eine zunehmende Dehydratisierung der Membran für die Permeabilitätsänderung verantwortlich sind. Nur ein minimaler Bruchteil der gesamten Permeabilitätsänderung kann vielleicht auf einen "Donnan-Effekt" an der selektiv Anionen-permeablen Membran zurückgeführt werden.

VI. Literaturverzeichnis

1. DAVSON, H. and DANIELLI, I.F.: Studies on the permeability of erythrocytes.
Biochem. J. 30: 316 (1936)

2. DONNAN, F.G.: Z. Elektrochem. 17: 572 (1911)

3. HOFFMAN, J.F.; TOSTESON, D.C. and WHITTAM, R.: Retention of potassium by human erythrocyte ghosts.
Nature (Lond.) 185: 186-187

4. PASSOW, H. und EGGERS, J.H.: Über einige Eigenschaften roter Blutkörperchen in hypertonischen Lösungen.
Pflüg. Arch. 252: 609-619 (1950)

5. PASSOW, H.: Passive ion permeability of the erythrocyte membrane.
Progr. Biophys. Molecul. Biology 19: 425 (1969 a)

6. PASSOW, H.: The molecular basis of ion discrimination in the erythrocyte membrane.
From "The Molecular Basis of Membrane Function", D.C. TESTESON, editor; 1969 by Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, (1969 b).

7. PASSOW, H. and STÄMPFLI, R.: Laboratory techniques in membrane biophysics.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1969 c.

8. TEORELL, T.: Permeability properties of erythrocyte ghosts.
J. gen. Physiol. 35: 669-701 (1952)

Herrn Professor Dr.rer.nat. H. Passow danke ich für die Überlassung des Themas und eines Arbeitsplatzes am II. Physiologischen Institut der Universität des Saarlandes. Danken möchte ich auch für seine immer bereitwillige Unterstützung und wertvollen Rat bei der Abfassung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 26. Oktober 1941 kam ich, Friedrich Klaus Josef Günther, in Würzburg als einziges Kind des Dipl.-Volkswirtes Benno Günther und seiner Ehefrau Henriette, geb. Tochtermann, zur Welt.

Nach Besuch der Volksschule von 1948 bis 1952 in Wernarz (Unterfranken) wurde ich im Herbst 1952 in die Oberrealschule in Gaibach (Unterfranken) umgeschult. Nach Umsiedlung meiner Eltern nach Aschaffenburg wechselte ich im Dezember 1954 in die Quinta des Goethe-Gymnasiums zu Dieburg in Hessen. Ich besuchte den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig.

Nach dem Abitur, das ich Ostern 1963 an dieser Schule ablegte, begann ich mit dem Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes.
Hier bestand ich am 30. Oktober 1964 die naturwissenschaftliche Vorprüfung, die ärztliche Vorprüfung und am 15. Dezember 1970 die ärztliche Prüfung.

Druck: Rotaprint - Offset - Druckerei Klein 6602 Dudweiler,